

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

LORRAINE STEPHANIE HISS

**EXTRATOS DE FOLHAS DE *ANNONA MURICATA* SÃO CITOTÓXICOS E REDUZEM A  
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Uberaba  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

LORRAINE STEPHANIE HISS

**EXTRATOS DE FOLHAS DE *ANNONA MURICATA* SÃO CITOTÓXICOS E REDUZEM A  
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Coorientadora: Profa. Anna Cecília D. M. Carneiro

Uberaba  
2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

H579e	<p>Hiss, Lorraine Stephanie Extratos de folhas de <i>Annona muricata</i> são citotóxicos e reduzem a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i> / Lorraine Stephanie Hiss. -- 2019. 76 f. : il., fig., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019 Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema Coorientadora: Profa. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro</p> <p>1. <i>Annona</i>. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Proliferação celular. I. Crema, Virgínia Oliveira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p>CDU 582.677.5</p>
-------	---

LORRAINE STEPHANIE HISS

**EXTRATOS DE FOLHAS DE *ANNONA MURICATA* SÃO CITOTÓXICOS E REDUZEM A  
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Uberaba, 06 de agosto de 2019

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema - Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Profa. Dra. Fernanda Bernadelli de Vito  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**DEDICATÓRIA**

---

Dedico esse trabalho a Deus e aos guias  
espirituais por todo amparo durante essa  
ádua jornada.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema** pelas oportunidades tão grandiosas nesse início de carreira acadêmica. Muito obrigada pela paciência, carinho e confiança, e por sempre me incentivar a alçar vôos mais altos.

À **Profa. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro** pelos ótimos conselhos e ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de Laboratório: **Arthur Silva Rezende, Bruna Raphaela Oliveira Silva** e **Isadora Caixeta da Silveira** pelos momentos divertidos e pela amizade sincera, para além do ambiente acadêmico.

Ao **Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva** por disponibilizar o laboratório de Fisiologia.

Aos técnicos do laboratório de Fisiologia: **Angélica Cristina Alves da Cruz, Lucas Felipe de Oliveira** e **Glauco da Rocha Finholdt** pelo apoio e ensinamentos na utilização do microscópio de fluorescência.

À **Profa. Dra. Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine** pela disponibilidade e oportunidade de agregar novos conhecimentos.

Aos técnicos **Douglas Côbo Micheli** e **Januário Barbosa dos Santos Júnior** por disponibilizarem os aparelhos do laboratório de Farmacologia, pela disposição e ajuda com nosso trabalho.

Aos professores da Pós-graduação em Ciências da Saúde pelo grande incentivo durante as disciplinas cursadas.

Aos secretários da pós-graduação **André Luís Rodrigues Costa** e **Tuânia Alves Cunha** pela disponibilidade e apoio constantes.

À colaboradora **Luciana de Oliveira Abílio** pelo cuidado impecável com o Laboratório de Histologia e também por nos contagiar diariamente com sua alegria renovadora.

Aos meus pais **Ricardo César Hiss** e **Eliane Carvalho Hiss** por dedicarem suas vidas a mim e me ensinarem a importância da educação.

Ao meu esposo **Jonathan de Andrade Muderno** pela dedicação, amor, carinho e paciência.

Aos meus irmãos **Ricardo César Hiss Jr.** e **Caroline Stephanie Hiss** pelo apoio e amizade verdadeira.





## **APOIO FINANCEIRO**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) – Edital 31/2017 PROPPG-UFTM N° C 08/2018

*“Não basta ensinar ao homem apenas uma especialidade porque ele se tornará assim, uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que ele adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo e do que é correto”.*

*Albert Einstein*

**RESUMO**

---

Os protocolos de tratamento de carcinoma epidermoide oral causam numerosos efeitos adversos, podendo dificultar funções importantes como: nutrição, fonação e respiração. Os compostos naturais têm sido estudados para o tratamento do câncer. A *Annona muricata* é usada com finalidade medicinal por anos, no entanto, sua participação na inibição da tumorigênese ainda não está completamente elucidada. Este estudo visou avaliar o efeito de extratos de *Annona muricata* sobre citotoxicidade e a proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral *in vitro*. Foi realizado *screening* fitoquímico para detecção de taninos, flavonóis/flavonas e alcaloides a 1 mg/mL. O IC<sub>50</sub> dos extratos: clorofórmico (EC), etanólico (EE) e metanólico (EM) foi determinado por meio de ensaio de incorporação do Vermelho Neutro por 24 h. Foi quantificado o percentual de células proliferativas por meio de ensaio de incorporação do Brdu em concentrações abaixo do IC<sub>50</sub> por 6 h. Foi considerada uma significância de  $p < 0,05$ . A quantidade de taninos em EC foi menor que em EE e EM ( $p < 0,0001$ ) e o teor de flavonóis e flavonas em EC foi maior que EE e EM ( $p < 0,001$ ). No entanto, a quantidade de taninos, flavonóis e flavonas foi similar em EE e EM. Não foram detectados alcaloides nos extratos estudados. Os extratos EC, EE e EM foram citotóxicos para células SCC-4, apresentando IC<sub>50</sub> de 6,48, 46,52 e 20,38 µg/mL, respectivamente. O percentual de células proliferativas foi significativamente menor em EC, EE e EM que o controle veículo, correspondendo a uma inibição da taxa proliferação celular de: 19%, 38% e 38%, respectivamente. Os resultados sugerem que os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* têm efeito citotóxico e antiproliferativo em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.

Palavras-chave: *Annona muricata*; carcinoma epidermoide oral; citotoxicidade; proliferação celular; células SCC-4.

**ABSTRACT**

---

Protocols for treatment of oral squamous cell carcinoma cause numerous adverse effects, which may interfere to important functions such as nutrition, phonation and respiration. Natural compounds has been studied for the treatment of cancer. *Annona muricata* has been used for medicinal purposes for years however its participation in the inhibition of tumorigenesis has not yet been fully elucidated. This study aimed to evaluate the effect of *Annona muricata* extracts on cytotoxicity and cell proliferation of SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma *in vitro*. Phytochemical screening was performed for the detection of tannins, flavonol/flavones and alkaloids at 1 mg/mL. The IC<sub>50</sub> of extracts: chloroform (EC), ethanolic (EE) e methanolic (EM) was determinate by the Neutral Red incorporation assay for 24 h. The percentage of proliferative cells was quantified by BrdU incorporation assay at concentrations below the IC<sub>50</sub> for 6 h. A significance of  $p < 0.05$  was considered. The quantity of tannins in EC was lower than in EE and EM ( $p < 0.0001$ ) and the flavonol and flavones content in EC was higher than EE and EM ( $p < 0.001$ ). However, the amount of tannins. However, the amount of tannins, flavonol and flavones was similar in EE and EM. No alkaloids were detected in the extracts studied by using this method. EC, EE and EM extracts were cytotoxic to SCC-4 cells, with IC<sub>50</sub> of 6.48, 46.52 and 20.38  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The percentage of proliferative cells was significantly lower in EC, EE and EM than the vehicle control, corresponding to an inhibition of the cell proliferation rate of 19%, 38% and, 38% respectively. These results suggest that chloroform, ethanolic and methanolic extracts of *Annona muricata* have a cytotoxic and antiproliferative effect on SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma.

Key words: *Annona muricata*; cell proliferation; cytotoxicity; oral squamous cell carcinoma; SCC-4 cells.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

Figura 1. Classificação histológica do carcinoma epidermoide oral.....	30
Figura 2. <i>Annona muricata</i> .....	32
Figura 3. Obtenção do extrato clorofórmico de folhas secas de <i>Annona muricata</i> .	41
Figura 4. Obtenção do extrato etanólico de folhas secas de <i>Annona muricata</i> . .....	42
Figura 5. Obtenção do extrato metanólico de folhas secas de <i>Annona muricata</i> . ...	42
Figura 6. Curva Padrão de ácido tânico para quantificação de taninos em extratos de <i>Annona muricata</i> .....	49
Figura 7. Curva Padrão de quercetina para quantificação de flavonóis e flavonas em extratos de <i>Annona muricata</i> .....	50
Figura 8. Determinação qualitativa de alcaloides em extratos de <i>Annona muricata</i>	51
Figura 9. Efeito do extrato clorofórmico de <i>Annona muricata</i> , sobre a viabilidade celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i> .....	52
Figura 10. Efeito do extrato etanólico de <i>Annona muricata</i> , sobre a viabilidade celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i> .....	53
Figura 11. Efeito do extrato metanólico de <i>Annona muricata</i> , sobre a viabilidade celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i> .....	54
Figura 12. Índice de citotoxicidade dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de <i>Annona muricata</i> em células SCC-4.....	55
Figura 13. Efeito dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de <i>Annona muricata</i> sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i> .....	57



## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. *Screening* fitoquímico de extratos de *Annona muricata*. ..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ANOVA - Análise de variância

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

BrdU - *5-bromo-2'-deoxyuridine*

BSA - *Albumin solution from bovine serum*

DAPI - *4',6-diamidino-2-fenilindole*

DMEM F-12 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DMSO - *Dimethylsulfoxide*

DPBS - *Dulbecco's salina tamponada fosfatada*

EAT - Equivalente de ácido tânico

EC - Extrato clorofórmico

EE - Extrato etanólico

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

EM - Extrato metanólico

EQ - Equivalente de quercetina

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

nm - nanômetros

PI3K - Proteína fosfoinositídeo 3-quinase

rpm - Rotações por minuto

SFB - Soro fetal bovino

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

---

1.INTRODUÇÃO .....	24
2.REVISÃO DE LITERATURA .....	26
2.1. MUCOSA ORAL .....	27
2.2. NEOPLASIAS .....	28
2.2.1. Carcinoma epidermoide oral .....	29
2.3. <i>ANNONA MURICATA</i> .....	31
2.3.1. Perfil fitoquímico de <i>Annona muricata</i> .....	34
3.HIPÓTESE .....	36
4.OBJETIVOS.....	38
4.1. OBJETIVO GERAL .....	39
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1. REAGENTES .....	41
5.2. PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>ANNONA MURICATA</i> .....	41
5.3. <i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO .....	43
5.3.1. Quantificação de taninos .....	43
5.3.2. Quantificação de flavonóis e flavonas .....	43
5.3.3. Identificação de alcaloides.....	44
5.4. CULTURA CELULAR.....	44
5.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE .....	45
5.6. AVALIAÇÃO DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	46
5.7. AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA .....	47
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6.RESULTADOS .....	48
6.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS .....	49
6.2. <i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO .....	49

6.3. CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>ANNONA MURICATA</i> EM CÉLULAS SCC-4 .....	52
6.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM OS EXTRATOS DE <i>ANNONA MURICATA</i> SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL <i>IN VITRO</i> .....	56
7.DISSCUSSÃO .....	58
8.CONCLUSÃO .....	64
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
10. ANEXOS .....	74
Anexo 1. Certificado de análise de folhas de <i>Annona muricata</i> .....	75
Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM.....	76
Anexo 3. Citotoxicidade dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de <i>Annona muricata</i> em células SCC-4.....	77

## 1.INTRODUÇÃO

---



O câncer oral inclui câncer de lábios, cavidade oral e orofaringe, sendo o sexto com maior risco de morte (SAH *et al.*, 2018). O carcinoma epidermoide oral é um tipo de lesão maligna de cabeça e pescoço, e cursa com altas taxas de morbidade e mortalidade (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2016; THOMSON, 2018). Os protocolos atuais para o tratamento desse câncer incluem intervenção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia. Porém, esses métodos causam numerosos efeitos adversos e o prognóstico depende da ressecabilidade do tumor (MONTERO e PATEL, 2015), bem como da presença e extensão de metástases linfonodais (BLATT *et al.*, 2017). E, os métodos invasivos podem ser desfigurantes e dificultar funções importantes como a nutrição, a fonação e a respiração (PARÉ e JOLY, 2017). Além disso, a resistência das células cancerígenas aos tratamentos disponíveis é um grande dificultador no tratamento do câncer (SARASWATHY e GONG, 2013). Sendo assim, a busca contínua por novos tratamentos para o câncer é claramente necessária. Os compostos naturais têm sido amplamente estudados, diante da necessidade de se encontrar tratamentos mais específicos e seletivos (PAES *et al.*, 2016) e, também, devido ao fácil acesso e baixo custo (PRABHAKARAN *et al.*, 2016).

Mais de 47% das drogas disponíveis atualmente para tratamento de câncer são derivadas de produtos naturais ou análogos sintéticos, e mais de 25.000 fitoquímicos identificados demonstraram atividade antineoplásica (RADY *et al.*, 2018).

A *Annona muricata*, membro da Família Annonaceae, popularmente conhecida como graviola, é uma planta frutífera nativa de países tropicais (RADY *et al.*, 2018). Extratos de folhas de *Annona muricata* são conhecidos por serem ricos em alcaloides, saponinas, terpenoides, flavonoides, cumarinas e outras lactonas, antroquinonas, taninos, glicosídeos cardíacos, fenóis, fitoesteróis, megastigmanos, ciclopeptídeos, óleos, minerais essenciais, como o K, Ca, Na, Cu, Fe e Mg e acetogeninas anonáceas, sendo que estas últimas são as principais responsáveis pela atividade anticancerígena e antiproliferativa (QAZI *et al.*, 2018; YAJID *et al.*, 2018). Estudos anteriores relataram que os extratos de *Annona muricata* podem atuar na tumorigênese por meio de sua ação citotóxica, indução de apoptose, necrose e redução da proliferação em diferentes linhagens de células neoplásicas,

incluindo: mama (SYED NAJMUDDIN *et al.*, 2016), próstata (ASARE *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016), colorretal (ABDULLAH *et al.*, 2017; INDRAWATI *et al.*, 2017), fígado (BANERJEE A *et al.*, 2017), pulmão (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014), leucemia (PIEME *et al.*, 2014), pâncreas (TORRES *et al.*, 2012), boca (MAGADI *et al.*, 2015) e pele (CHAMCHEU *et al.*, 2018).

Previamente, foi relatada a atividade citotóxica do extrato aquoso de folhas de *Annona muricata* em células SCC-25 de carcinoma epidermoide oral (MAGADI *et al.*, 2015). No entanto, estudos sobre o efeito dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* sobre a viabilidade e a proliferação celular utilizando linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado ainda não foram descritos na literatura.

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de novas terapias para o câncer, este estudo visou avaliar o efeito do tratamento com os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* sobre a viabilidade e a proliferação celular de carcinoma epidermoide oral.

## **2.REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2.1. MUCOSA ORAL

A cavidade bucal compreende a região entre o vermelhão dos lábios, o istmo orofaríngeo, as bochechas, o assoalho bucal e junção entre o palato duro e palato mole e pode ser subdividida anatomicamente em duas regiões: o vestíbulo externo limitado pelas bochechas e lábios e a cavidade oral propriamente dita, localizada posteriormente à gengiva e às arcadas dentárias (TEN CATE, 2001; KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

A mucosa oral é classificada histologicamente em: mucosa de revestimento, constituída por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado; mucosa oral mastigatória, formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado; e, mucosa oral especializada, que possui o neuroepitélio. Nas áreas expostas aos choques mecânicos da mastigação, o epitélio é queratinizado, uma vez que a camada de queratina é fundamental para dissipar as forças de cisalhamento. Já nas regiões onde é necessária uma maior flexibilidade do tecido, o epitélio não é queratinizado, para permitir a fala e acomodação do bolo alimentar (NANCI, 2013).

São vistos no epitélio oral: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Sua renovação é feita por meio de células-tronco presentes na camada basal do epitélio. Essas sofrem mitoses sucessivas e migram em direção às camadas mais superficiais, substituindo os queratinócitos em descamação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). Para que haja um equilíbrio no tecido, a taxa de descamação deve ser igual à taxa de renovação, uma vez que esse epitélio fornece proteção contra microrganismos, irritação mecânica e contra o ressecamento (TEN CATE, 2001; KATCHBURIAN e ARANA, 2004). A perda desse equilíbrio está diretamente relacionada com os processos de saúde e doença da mucosa oral (QIN *et al.*, 2017). Inúmeras alterações patológicas podem surgir no epitélio da mucosa oral, como: leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e líquen plano. Essas aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias orais como, o carcinoma epidermoide oral (GANESH *et al.*, 2018).

## 2.2. NEOPLASIAS

Em células neoplásicas a proliferação celular é anormal, descontrolada e autônoma, além de haver perda ou redução da diferenciação celular, como consequência de alterações em genes e proteínas que regulam esses processos biológicos (KUMAR *et al.*, 2016). Essas alterações genéticas permitem que as células neoplásicas sejam autossuficientes em sinais de crescimento, insensíveis a sinais anti-crescimento, adquiram potencial de duplicação ilimitado, capacidade de evasão da apoptose, elevado potencial de angiogênese e capacidade de migrar e invadir tecidos, formando metástase (BRASILEIRO FILHO, 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A carcinogênese resulta de múltiplas etapas e pode envolver centenas de genes. Podem ocorrer mutações, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos (ROCHA e SILVA, 2003). Em consequência dessas alterações, surgem modificações estruturais em receptores e proteínas intracelulares que participam de diversas vias de sinalização, envolvidas em inúmeros processos celulares, como, a proliferação celular (SEVER e BRUGGE, 2015).

As células que compõe um tecido malignizado apresentam baixo potencial de diferenciação, altas taxas de multiplicação e capacidade de invadir tecidos e originar metástase, sendo assim, grande parte dos casos estão associados a um mau prognóstico (KUMAR *et al.*, 2016).

As neoplasias que se desenvolvem no tecido epitelial estratificado escamoso são denominadas carcinomas de células escamosas. Aproximadamente 80% dos cânceres humanos são carcinomas, e isto, se deve a dois fatores: alta taxa proliferativa do tecido epitelial e a elevada exposição desse tecido a agentes físicos e químicos (NEVILLE *et al.*, 2009).

### 2.2.1. Carcinoma epidermoide oral

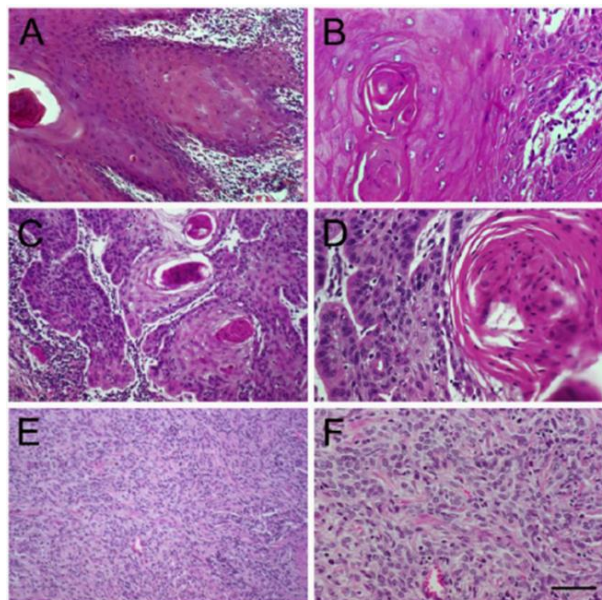
O carcinoma epidermoide oral é uma lesão maligna que se desenvolve nas células escamosas do epitélio de revestimento da mucosa oral e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo a taxa de sobrevivência de apenas 37,8% cinco anos após o diagnóstico da doença (RIVERA *et al.*, 2017). É o principal tipo de lesão maligna que acomete a região de cabeça e pescoço, e corresponde a 90% dos cânceres de cavidade oral (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2016; THOMSON, 2018). A língua é o sítio mais frequentemente acometido, seguido pelo palato mole e assoalho da boca (DE MORAIS *et al.*, 2017).

A patogênese do carcinoma epidermoide oral é multifatorial e está associada a fatores extrínsecos e intrínsecos. Os fatores extrínsecos incluem os agentes externos como: o fumo, o consumo de álcool, a infecção pelo papiloma vírus humano, a infecção pelo *Treponema pallidum* e a radiação ultravioleta. Já os fatores intrínsecos incluem estados sistêmicos ou generalizados, como a imunossupressão, alterações genéticas e deficiências nutricionais (NEVILLE *et al.*, 2009; DE MORAIS *et al.*, 2017; PORTER *et al.*, 2018).

Essa neoplasia é mais prevalente em homens devido ao fato desses estarem mais expostos aos principais fatores de risco que são o álcool e o fumo (RUBACK *et al.*, 2012; MORO *et al.*, 2018). O risco de desenvolvimento de carcinoma epidermoide oral aumenta com a idade, sendo mais frequente a partir da quinta década de vida (TANDON *et al.*, 2017). Dados estatísticos apontam para cada ano do biênio 2018 - 2019, somente no Brasil, a incidência de 14.700 novos casos, sendo, 11.200 em homens e 3.500 em mulheres (INCA, 2018).

O carcinoma epidermoide oral pode ser classificado em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (Figura 1). Para essa classificação são avaliados: o grau de queratinização, o pleomorfismo celular/nuclear e a atividade mitótica. O carcinoma epidermoide oral bem diferenciado é semelhante ao epitélio escamoso normal, apresenta grande quantidade de queratinização na forma de pérolas de queratina. O carcinoma epidermoide oral moderadamente diferenciado é caracterizado pelo pleomorfismo nuclear moderado, figuras de mitoses atípicas e baixo grau de queratinização. No

carcinoma epidermoide oral pouco diferenciado há um predomínio de células indiferenciadas, baixo grau de queratinização e numerosas mitoses atípicas (PEREIRA *et al.*, 2007; PADMA *et al.*, 2017).



**Figura 1. Classificação histológica do carcinoma epidermoide oral.**

Coloração de hematoxilina e eosina. (A e B) Bem diferenciado. (C e D) Moderadamente diferenciado. (E e F) Pouco diferenciado. (A, C, E) Barra = 50 µm; (B, D, F) Barra = 25 µm. Fonte: Do autor.

A classificação histológica do carcinoma epidermoide oral é fundamental para direcionar o tratamento do paciente (PADMA *et al.*, 2017). Também deve ser levada em conta para fins de prognóstico e tratamento a agressividade do tumor, sua extensão e sua capacidade de disseminação para linfonodos locais ou para formar metástase à distância (KADEMANI, 2007).

Os tumores em estágio inicial são tratados com excisão cirúrgica ou radioterapia, já os tumores em estágios mais avançados exigem uma combinação entre excisão cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia (MACHIELS *et al.*, 2014). Apesar dos avanços da medicina e utilização de novas estratégias terapêuticas para combater esse carcinoma, sua elevada propensão para gerar metástases eleva consideravelmente o número de mortes (THOMSON, 2018). Sendo assim, existe a necessidade de desenvolvimento de tratamentos alternativos que sejam capazes de impedir a progressão dessa neoplasia.

### 2.3. *ANNONA MURICATA*

O estudo de plantas medicinais, a farmacognosia, é uma prática comum em todo o mundo devido à facilidade de obtenção e o baixo custo (VEIGA, 2008; PRABHAKARAN *et al.*, 2016). A eficácia das plantas no tratamento de doenças está associada à ampla variedade de compostos químicos complexos que estão presentes em folhas, frutos, caules e sementes (AYAZ *et al.*, 2017).

A fitoterapia pode ser empregada no tratamento de diversas enfermidades como: inflamações, infecções, parasitoses e câncer (PRABHAKARAN *et al.*, 2016). Muitos medicamentos utilizados na atualidade são derivados de plantas, inclusive fármacos antineoplásicos como a camptotecina, a vincristina, a vinblastina, o taxol, a podofilotoxina e a combretastatina (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

A *Annona muricata* (Figura 2) é uma árvore frutífera, popularmente conhecida como: graviola, pinha, guanabana, anona-de-espinho, jaca-de-pobre, jaca-do-pará, coração-de-rainha, araticum-grande e araticum-manso. É nativa das áreas tropicais mais quentes das Américas do Sul e do Norte e, também, pode ser encontrada em regiões subtropicais (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015; PRABHAKARAN *et al.*, 2016).

De acordo com a classificação taxonômica a graviola pertence ao reino Plantae, divisão angiosperma (Magnoliophyta), classe Magnolids, ordem Magnoliales, Família Annonaceae, subfamília Annonoideae, gênero *Annona* e espécie *Annona muricata*. A Família Annonaceae é composta por aproximadamente 130 gêneros e 2300 espécies, enquanto o gênero *Annona* é formado por mais de 70 espécies, sendo que a *Annona muricata* é a mais amplamente cultivada (ABDUL WAHAB *et al.*, 2018).

A gravioleira é uma árvore terrestre e perene que pode atingir até 10 metros de altura. Possui casca aromática, folhas alternas e pecioladas verdes brilhantes e flores axilares com coloração amarelada. Seu fruto apresenta formato elipsoide, casca espessa de coloração verde escura e polpa esbranquiçada com sementes escuras, e pode medir aproximadamente 30 cm de comprimento e 12 cm de largura (CORRÊA, 1978; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015). A polpa da graviola é amplamente



utilizada na fabricação de sucos, xaropes, sorvetes, geleias e doces (LIMA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006).



**Figura 2. *Annona muricata*.**

A- Árvore; B- Folhas; C- Flores, D- Fruto e E- Sementes. Fonte: (ABDUL WAHAB *et al.*, 2018).

Diferentes partes de *Annona muricata* são popularmente utilizadas no tratamento de doenças em muitos países. A polpa da fruta é usada para tratar dores, neuralgia, artrite, diarreia, disenteria, febre, malária, parasitoses, reumatismo, e como estimulante de lactação materno após o parto. O chá feito a partir da decocção das folhas é utilizado no tratamento de cistite, diabetes, enxaquecas, reumatismo, neuralgias, insônia e abscessos. Na América do Sul e em alguns países da África tropical as folhas de *Annona muricata* são utilizadas no tratamento de câncer. As sementes apresentam eficácia contra helmintos e outros parasitas. Também, foram relatados efeito anti-inflamatório, hipoglicêmico, sedativo, relaxante muscular liso, hipotensor e antiespasmódico da utilização de folhas, cascas e raízes de *Annona*

*muricata* (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015). Em virtude desse amplo uso popular, atualmente os extratos de *Annona muricata* têm sido estudados para serem utilizados como fitoterápicos (ABDUL WAHAB *et al.*, 2018).

Previamente, foi relatado que os extratos de *Annona muricata* podem interferir na gênese do tumor por meio de sua ação citotóxica, indução de apoptose, necrose e redução da proliferação em diferentes linhagens de células tumorais, incluindo: mama (SYED NAJMUDDIN *et al.*, 2016), próstata (ASARE *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016), colorretal (ABDULLAH *et al.*, 2017; INDRAWATI *et al.*, 2017), fígado (BANERJEE A *et al.*, 2017), pulmão (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014), leucemia (PIEME *et al.*, 2014), pâncreas (TORRES *et al.*, 2012), oral (MAGADI *et al.*, 2015) e pele (CHAMCHEU *et al.*, 2018).

### 2.3.1. Perfil fitoquímico de *Annona muricata*

Foram identificados 212 compostos bioativos em extratos de *Annona muricata* e desses, 74 exibiram efeito anticâncer em cultura celular pré-clínica e em estudos com modelos animais (CORIA-TÉLLEZ *et al.*, 2016). Esses extratos são ricos em alcaloides, saponinas, terpenoides, flavonoides, cumarinas e outras lactonas, antroquinonas, taninos, glicosídeos cardíacos, fenóis, fitoesteróis, megastigmanos, ciclopeptídeos, óleos, minerais essenciais, como o K, Ca, Na, Cu, Fe e Mg e acetogeninas anonáceas, sendo que essas últimas são as principais responsáveis pela atividade anticancerígena e antiproliferativa (QAZI *et al.*, 2018; YAJID *et al.*, 2018).

As acetogeninas anonáceas formam uma classe de produtos naturais isolados exclusivamente da Família Annonaceae. Até o momento aproximadamente 120 acetogeninas anonáceas foram identificadas em extratos orgânicos de *Annona muricata*. Essas são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa da via dos policetídeos e consistem de uma extensa cadeia de carbonos (C32 ou C34), ligados a um anel  $\gamma$ -lactona, terminalmente substituído por metilo  $\beta$ -insaturado, com um ou dois anéis tetrahydrofuranos (THF). Estudos prévios relataram que as acetogeninas apresentam potencial citotóxico seletivo contra células tumorais (GAVAMUKULYA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015; LIAW *et al.*, 2016). Esse efeito foi avaliado nas linhagens: (A-549) de carcinoma de pulmão humano, (MCF-7) de carcinoma de mama humano, (HT-29) de adenocarcinoma de cólon humano, (A-498) de carcinoma de rins humano, (PC-3) de adenocarcinoma de próstata humano, (PaCa-2) de carcinoma pancreático humano, (KB) de carcinoma epidermoide de nasofaringe, (Hep G2) de carcinoma hepatocelular humano, (Hep 2,2,15) de hepatoma HBV transfectado humano e (1-A9) de câncer de ovário humano (PAES *et al.*, 2016).

A citotoxicidade das acetogeninas anonáceas decorre da forte inibição do complexo mitocondrial I, envolvido no transporte de elétrons do NADH até a ubiquinona, processo essencial para a produção de energia pelas mitocôndrias. Com a inibição deste complexo a produção de ATP é reduzida e a célula entra em apoptose (ZENG *et al.*, 1996). E ainda, as acetogeninas anonáceas são potentes inibidoras da NADH

oxidase, enzima prevalente na membrana plasmática de células tumorais, que permite que a célula neoplásica produza ATP em condições anaeróbicas para restaurar os níveis de NAD e permitir a glicólise e a fosforilação ao nível do substrato. Ambos os mecanismos de ação resultam na inibição da síntese de ATP, o que poderia explicar a sensibilidade das linhagens de células neoplásicas, uma vez que essas necessitam de uma maior demanda de energia, quando comparadas às células saudáveis (PAES *et al.*, 2016).

As acetogeninas anonáceas também são eficazes para tumores resistentes a múltiplas drogas, visto que, nas membranas das células neoplásicas são encontradas proteínas, como a glicoproteína P (P-gp), que atua como bombas que expulsam os fármacos para o exterior, impedindo o acúmulo intracelular. Essa proteína é transmembranar e necessita de ATP para seu funcionamento. Desse modo, quando as acetogeninas anonáceas inibem o complexo mitocondrial I e a enzima NADH oxidase os níveis intracelulares de ATP são reduzidos, diminuindo a eficácia da bomba de efluxo P-gp (PAES *et al.*, 2016). Também, foi demonstrado que as acetogeninas anonáceas são capazes de induzir a apoptose em células tumorais, por mecanismos que não envolvem a cadeia respiratória mitocondrial (CHIH *et al.*, 2001). Por esses diferentes mecanismos, as acetogeninas anonáceas foram consideradas candidatas para se tornarem fármacos antitumorais (PAES *et al.*, 2016).

### **3.HIPÓTESE**

---

Os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de folhas de *Annona muricata* são citotóxicos e inibem a proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado.

## **4.OBJETIVOS**

---

#### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* sobre a viabilidade e a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o *Screening* fitoquímico dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata*, para quantificação de taninos, flavonóis/flavonas e identificação de alcaloides.
- Avaliar o efeito dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* sobre a viabilidade de células SCC-4 para determinar o índice de citotoxicidade - IC<sub>50</sub>.
- Comparar a taxa de proliferação de células SCC-4 controle e tratadas com os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata*.



## **5.MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 5.1. REAGENTES

O clorofórmio, etanol e metanol foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), o 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), o Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 (DMEM-F12), o dimethylsulfoxide (DMSO), o bovine serum albumin (BSA), o Triton X-100 0,2%, o paraformaldeído, os antibióticos penicilina e estreptomicina, e os sais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A hidrocortisona e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Ariston (São Paulo, SP, Brasil) e da Cultilab (Campinas, SP, Brasil), respectivamente. O anticorpo primário anti-BrdU foi adquirido da Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) e o anticorpo secundário anti-mouse Alexa 488 foi obtido da Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

### 5.2. PREPARO DOS EXTRATOS DE *ANNONA MURICATA*

As folhas secas de *Annona muricata* foram obtidas comercialmente da Santosflora Comércio de Ervas LTDA (Mairiporã, SP, Brasil), Lote- AUTO6601 - (certificado de análises - Anexo 1).

O extrato clorofórmico foi preparado por meio da maceração de 100 g de folhas secas de *Annona muricata* em 1 litro de clorofórmio, por duas semanas à temperatura ambiente. A solução foi filtrada e submetida à evaporação do clorofórmio (Figura 3).



Figura 3. Obtenção do extrato clorofórmico de folhas secas de *Annona muricata*.

O extrato etanólico foi obtido subsequentemente à extração do extrato clorofórmico. Foi adicionado ao macerado clorofórmico 1 litro de etanol, por duas semanas à temperatura ambiente. A solução foi filtrada e submetida à evaporação do etanol (Figura 4).

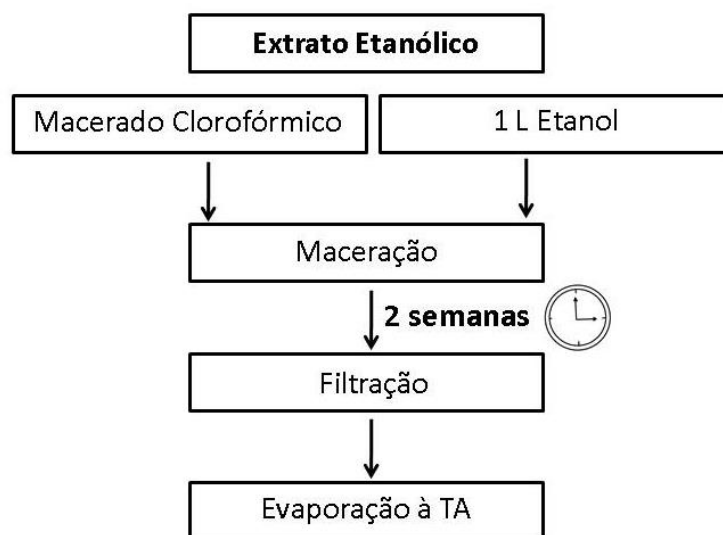


Figura 4. Obtenção do extrato etanólico de folhas secas de *Annona muricata*.

O extrato metanólico foi preparado por meio da maceração de 100 g de folhas secas de *Annona muricata* em 1 litro de metanol, por duas semanas à temperatura ambiente. A solução foi filtrada e submetida à evaporação do metanol (Figura 5).

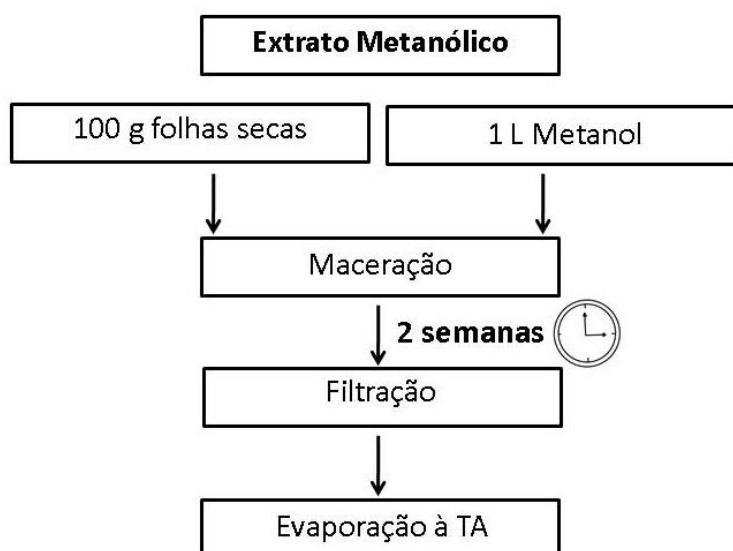


Figura 5. Obtenção do extrato metanólico de folhas secas de *Annona muricata*.

Após a completa evaporação dos solventes, os extratos foram solubilizados em DMSO na concentração de 0,1 g/mL, homogeneizados em ultrassom por 1 hora e armazenados a 4°C.

### 5.3. SCREENING FITOQUÍMICO

Foi realizada uma análise quantitativa de taninos, flavonóis e flavonas e uma avaliação qualitativa de alcaloides em extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata*. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

#### 5.3.1. Quantificação de taninos

De acordo com métodos previamente descritos (SEIGLER *et al.*, 1986), aos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico diluídos em água na concentração de 1 mg/mL foram adicionados: reagente de Folin-Denis ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,30 M,  $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$   $\text{H}_2\text{O}$  0,01 M e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,51 M) e carbonato de sódio a 8%. Para a curva padrão, foram utilizadas quercetina nas concentrações: 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL e 0,006 mg/mL. Após 2 horas e centrifugação a 2.000 rpm, as leituras espectrofotométricas dos sobrenadantes foram realizadas em 725 nm.

Para calcular a fórmula da curva padrão foi utilizado o programa Microsoft Excel® (Redmond, Washington, Estados Unidos). O conteúdo de taninos nos extratos estudados foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva padrão. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido tânico (EAT) por miligrama.

#### 5.3.2. Quantificação de flavonóis e flavonas

De acordo com métodos convencionais (CHANG *et al.*, 2002), aos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico diluídos em etanol 80% na concentração de 1 mg/mL foram adicionados: etanol 95%, cloreto de alumínio a 10%, acetato de potássio 1 M e água destilada. Para a curva padrão, foram utilizadas quercetina nas concentrações: 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL e 0,006

mg/mL. Após 30 minutos, foi realizada leitura espectrofotométrica em filtro de 405 nm.

Para calcular a fórmula da curva padrão foi utilizado o programa Microsoft Excel® (Redmond, Washington, Estados Unidos). O conteúdo de flavonóis e flavonas nos extratos estudados foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva padrão. Os resultados foram expressos em equivalente de quercetina (EQ) por miligrama.

### 5.3.3. Identificação de alcaloides

De acordo com o método descrito por COSTA (COSTA, 2002), aos extratos solubilizados em água destilada 1 mg/mL, foram adicionados: água destilada e ácido sulfúrico a 10%. Após ebulição e filtração, foram realizados os testes na concentração 1:1, utilizando os reagentes: Mayer ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  0,02 M e KI 0,12 M), Bertrand ( $\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{16})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,01 M em solução  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6 N), Dragendorf ( $\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9$  ( $\text{NO}_3$ )<sub>4</sub> 0,01 M,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  4,16 M e KI 2,4 M) e Wagner ( $\text{I}_2$  0,05 M e KI 0,12 M). A solução de pilocarpina 2%, um alcaloide natural, foi utilizada como controle positivo da reação.

### 5.4. CULTURA CELULAR

Foram utilizadas células da linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado (ATCC® CRL-1624™), obtidas através do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Anexo 2).

As células SCC-4 foram cultivadas em garrafa T75, contendo DMEM-F12, SFB 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 400 ng/mL de hidrocortisona. As células foram mantidas em incubadora úmida com atmosfera 5%  $\text{CO}_2$ /95% ar a 37°C.

Os experimentos foram realizados quando as células atingiram a confluência mínima de 70%.

## 5.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para avaliar o índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* foram realizados os testes de incorporação do corante vital 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (vermelho neutro), conforme métodos convencionais (BORENFREUND e PUERNER, 1985). Esse corante catiônico e hidrossolúvel é capaz de atravessar as membranas celulares por difusão passiva não iônica e se acumular nos lisossomos de células viáveis por meio de ligações eletrostáticas a grupos de ânions da matriz lisossomal. Quando a célula sofre algum tipo de lesão na membrana sua capacidade de absorção do corante é reduzida, portanto, pela quantificação da intensidade da coloração é possível mensurar a quantidade de células vivas, lesionadas ou mortas (TRIGLIA *et al.*, 1991; FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas experimentais. Aproximadamente  $1 \times 10^4$  células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral por poço foram semeadas em placas de 96 poços e cultivadas em DMEM-F12, contendo 100 U/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 400 ng/mL de hidrocortisona e SFB 10% em incubadora úmida com atmosfera 5% de  $CO_2$ /95% ar a 37°C por 24 horas. Em seguida, o meio foi desprezado e foram adicionados ao meio de células controle meio DMEM-F12, contendo SFB 7,5%, antibióticos 1%, hidrocortisona e DMSO 0,4% (controle veículo). E ao meio de células tratadas foram adicionados 200  $\mu$ L de meio DMEM-F12, contendo SFB 7,5%, hidrocortisona, antibióticos 1% e extratos clorofórmico, etanólico e metanólico nas concentrações: 10, 20, 40, 80 e 160  $\mu$ g/mL. As células foram mantidas em incubadora úmida com atmosfera 5% de  $CO_2$ /95% ar a 37°C por 24 horas. Após esse período, os meios foram desprezados e foram adicionados DMEM-F12, contendo SFB 7,5%, antibióticos 1%, hidrocortisona e o corante vermelho neutro por 3 horas. Em seguida, o meio foi desprezado, os poços foram lavados com PBS e foram adicionados solução de ácido acético 1% em álcool 50% por 20 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro com filtro de 540 nm.

## 5.6. AVALIAÇÃO DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Foi realizado o ensaio de incorporação de BrdU, para avaliar o efeito dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* sobre a proliferação de células SCC-4 cultivadas em monocamada. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas experimentais.

Aproximadamente  $0,8 \times 10^4$  células SCC-4 por poço foram cultivadas em placas de seis poços contendo lamínulas de vidro em incubadora úmida com atmosfera 5% CO<sub>2</sub>/95% ar a 37°C *overnight*. As células foram incubadas com meio DMEM-F12, contendo 100 U/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 400 ng/mL de hidrocortisona e SFB 10%. Ao meio de células controle foi adicionado DMSOv 0,4% (controle veículo) e ao meio de células tratadas foram adicionados os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* nas concentrações abaixo de seus IC<sub>50</sub>. Foi adicionado ao meio de células controle e tratadas, 0,5 µg/mL de BrdU.

Após 6 h de tratamento, as células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral foram lavadas com DPBS, com cálcio e magnésio, duas vezes por 5 minutos. Fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora. Novamente lavadas com DPBS duas vezes por 5 minutos. Foi feita incubação com HCl 1 N por 1 hora a 37°C. Lavadas com DPBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% por 5 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com DPBS/BSA 3% por 20 minutos. Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpos primários anti-BrdU na diluição 1:50 em DPBS/BSA 0,1% *overnight*. Novamente lavadas com DPBS duas vezes por 10 minutos, e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse Alexa 488, na diluição 1:1000 em DPBS/BSA 0,1% por 2 horas, em câmara úmida escura e temperatura ambiente. A evidenciação dos núcleos foi feita com o DAPI diluído 1:500 em DPBS por 15 minutos. Finalmente, as células foram lavadas com DPBS duas vezes por 5 minutos e as lâminas foram montadas.

### 5.7. AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Foram quantificados os núcleos de todas as células marcadas com DAPI e das células positivas para BrdU (células proliferativas) em dez campos aleatórios em microscópio de fluorescência LSM 510 Meta (Zeiss®, Göttingen, Lower Saxony, Germany). O percentual de células positivas para BrdU foi calculado utilizando o programa Microsoft Excel® (Redmond, Washington, Estados Unidos).

### 5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com os programas IBM SPSS 20.0® (San Francisco, CA, USA) e Graphpad Prism® (San Diego, CA, USA). O índice citotóxico - IC<sub>50</sub> foi determinado por regressão não linear. Foram utilizados os testes: análise de variância de Levene, ANOVA e o pós-teste de Tukey, e teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



## **6.RESULTADOS**

---

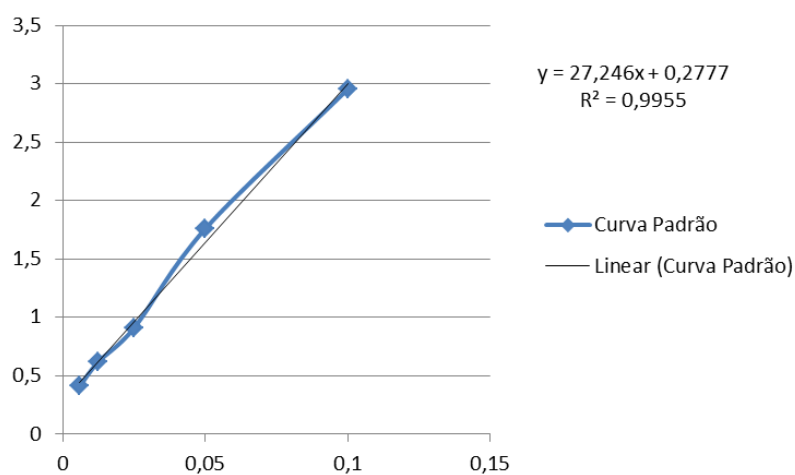
## 6.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS

A maceração de 100 g de folhas secas de *Annona muricata* em clorofórmio, etanol e metanol rendeu 4,3613 g de extrato clorofórmico, 4,0072 g de extrato etanólico e 7,7876 g de extrato metanólico.

## 6.2. SCREENING FITOQUÍMICO

Para a quantificação de taninos em extratos de *Annona muricata* foi feita uma curva padrão de ácido tânico para a interpolação dos resultados obtidos na leitura espectrofotométrica das amostras de extratos clorofórmico, etanólico e metanólico (Figura 6).

A quantidade de taninos foi diferente entre os extratos de *Annona muricata* estudados [ $F(2,6)=270,5$ ,  $p<0,0001$ ]. O teor de taninos no extrato clorofórmico foi menor que nos extratos etanólico ( $p<0,0001$ ) e metanólico ( $p<0,0001$ ). No entanto, a quantidade de taninos foi similar nos extratos etanólico e metanólico ( $p>0,05$ ), (Tabela 1).

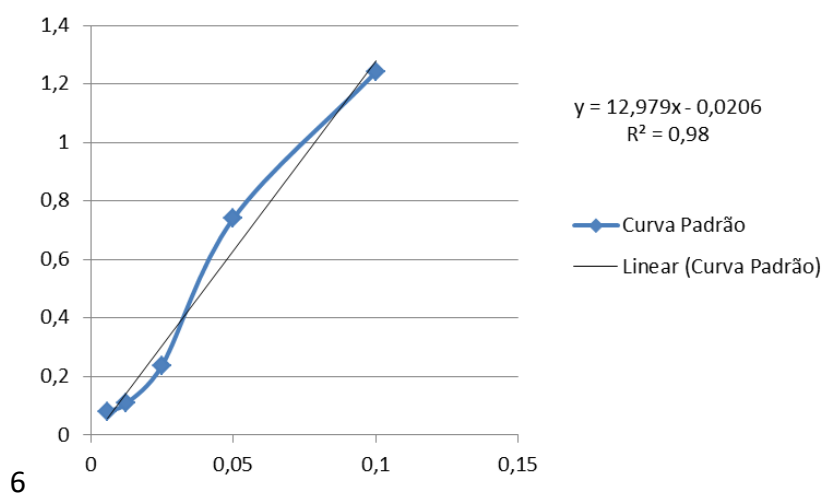


**Figura 6. Curva Padrão de ácido tânico para quantificação de taninos em extratos de *Annona muricata*.**

Concentrações de ácido tânico utilizadas: 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL e 0,006 mg/mL.

Foi feita uma curva padrão de quercetina para a interpolação dos resultados obtidos na leitura espectrofotométrica das amostras de extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* para a quantificação de flavonóis e flavonas (Figura 7).

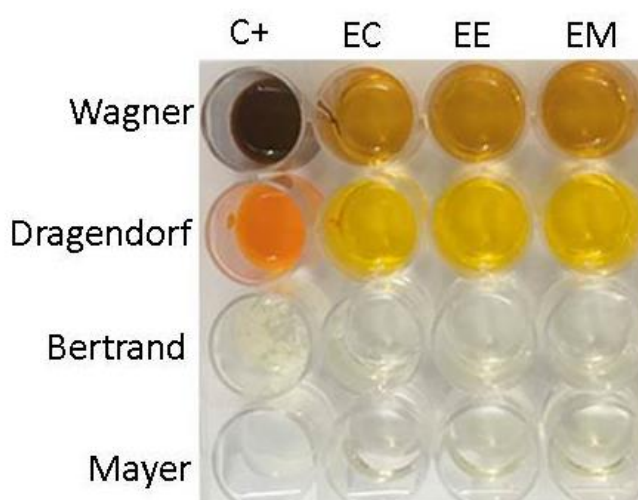
O teor de flavonóis e flavonas foi diferente entre os extratos de *Annona muricata* estudados [F(2,6)=30,24, p<0,0001]. A quantidade de flavonóis e flavonas em extrato clorofórmico foi maior que nos extratos etanólico (p<0,001) e metanólico (p<0,0001). No entanto, a quantidade de flavonóis e flavonas foi similar nos extratos etanólico e metanólico (p>0,05), (Tabela 1).



**Figura 7. Curva Padrão de quercetina para quantificação de flavonóis e flavonas em extratos de *Annona muricata*.**

Concentrações de quercetina utilizada: 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL e 0,006 mg/mL.

Para uma análise qualitativa de presença de alcaloides em extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata*, foram feitos quatro testes: reagente de Mayer, reagente de Bertrand, reagente de Dragendorff e reagente de Wagner, utilizando uma solução de pilocarpina, que é um alcaloide natural, como controle positivo da reação. No entanto, não foi detectada a presença de alcaloides nos extratos estudados pelos métodos utilizados (Figura 8 e Tabela 1).



**Figura 8. Determinação qualitativa de alcaloides em extratos de *Annona muricata*.**

Controle positivo Pilocarpina (C+), extrato clorofórmico (EC), extrato etanólico (EE) e extrato metanólico (EM). Análise qualitativa de presença de alcaloides, utilizando os reagentes de Wagner, Dragendorff, Bertrand e Mayer.

**Tabela 1. Screening fitoquímico de extratos de *Annona muricata*.**

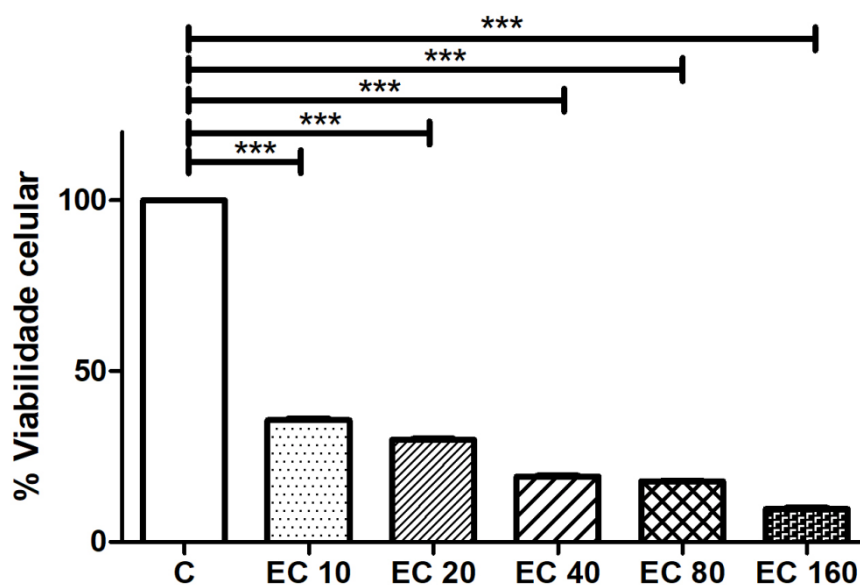
Componentes	EC	EE	EM
Taninos (EAT/mg)	0,444±0,008 <sup>a,b</sup>	1,131±0,058	1,160±0,044
Flavonois e Flavonas (EQ/mg)	0,117±0,011 <sup>c,d</sup>	0,049±0,014	0,039±0,014
Alcaloides	-	-	-

Extratos de *Annona muricata* a 1 mg/mL: clorofórmico (EC), etanólico (EE) e metanólico (EM). Os resultados foram expressos em equivalente de ácido tânico (EAT) e equivalente de quercetina (EQ) por miligrama - média ± desvio padrão. <sup>a,c</sup>EC vs EE, <sup>b,d</sup>EC vs EM. ANOVA e pós-teste de Tukey: <sup>a,b,d</sup>p<0.0001 e <sup>c</sup>p<0.001.

### 6.3. CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *ANNONA MURICATA* EM CÉLULAS SCC-4

Para avaliação da viabilidade celular, o percentual de células tratadas com os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* foi normalizado, e o grupo controle veículo foi considerado como 100% de células viáveis (Anexo 3).

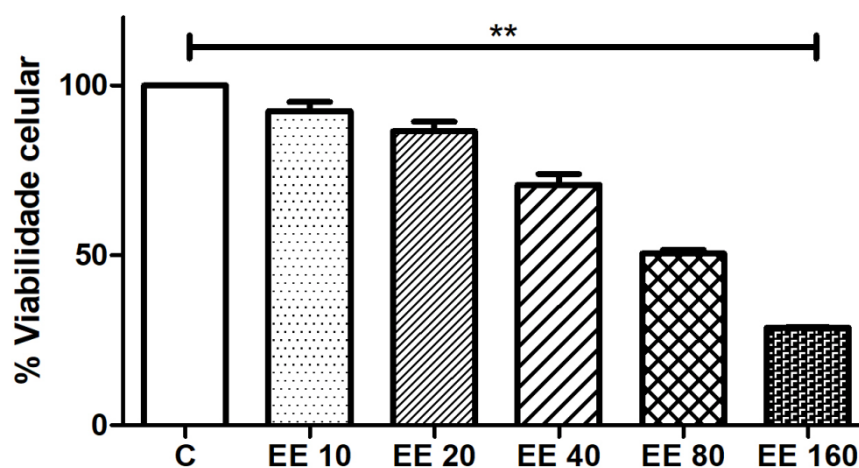
Houve diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade de células SCC-4 estudadas: controle veículo e tratadas com diferentes concentrações de extrato clorofórmico de *Annona muricata* [ $F(5,17)=11073,79$ ,  $p<0,0001$ ]. Todas as concentrações de extrato clorofórmico testadas (10, 20, 40, 80 e 160  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziram significativamente a viabilidade celular quando comparado ao controle veículo (Figura 9).



**Figura 9.** Efeito do extrato clorofórmico de *Annona muricata*, sobre a viabilidade celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.

Ensaio de incorporação de vermelho neutro por 24 horas. Percentual de células SCC-4 viáveis controle veículo (C) e tratadas com o extrato clorofórmico nas concentrações: 10  $\mu\text{g/mL}$  (EC10), 20  $\mu\text{g/mL}$  (EC20), 40  $\mu\text{g/mL}$  (EC40), 80  $\mu\text{g/mL}$  (EC80) e 160  $\mu\text{g/mL}$  (EC160). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA e pós-teste de Tukey: \*\*\* $p<0,0001$ .

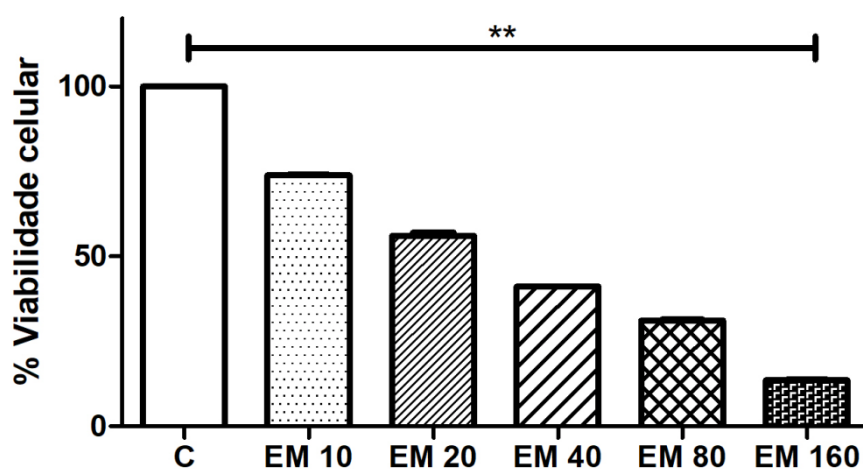
Houve diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade de células SCC-4 controle veículo e tratadas com extrato etanólico de *Annona muricata* estudadas [ $\chi(5)=16,47$ ,  $p<0,05$ ]. Foi vista uma tendência de diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração de extrato etanólico, no entanto, apenas o extrato etanólico a 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi significativamente menor que o controle veículo (Figura 10).



**Figura 10.** Efeito do extrato etanólico de *Annona muricata*, sobre a viabilidade celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.

Ensaio de incorporação de vermelho neutro por 24 horas. Percentual de células SCC-4 viáveis controle veículo (C) e tratadas com o extrato etanólico nas concentrações: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (EE10), 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (EE20), 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (EE40), 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (EE80) e 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (EE 160). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn:  $**p<0,001$ .

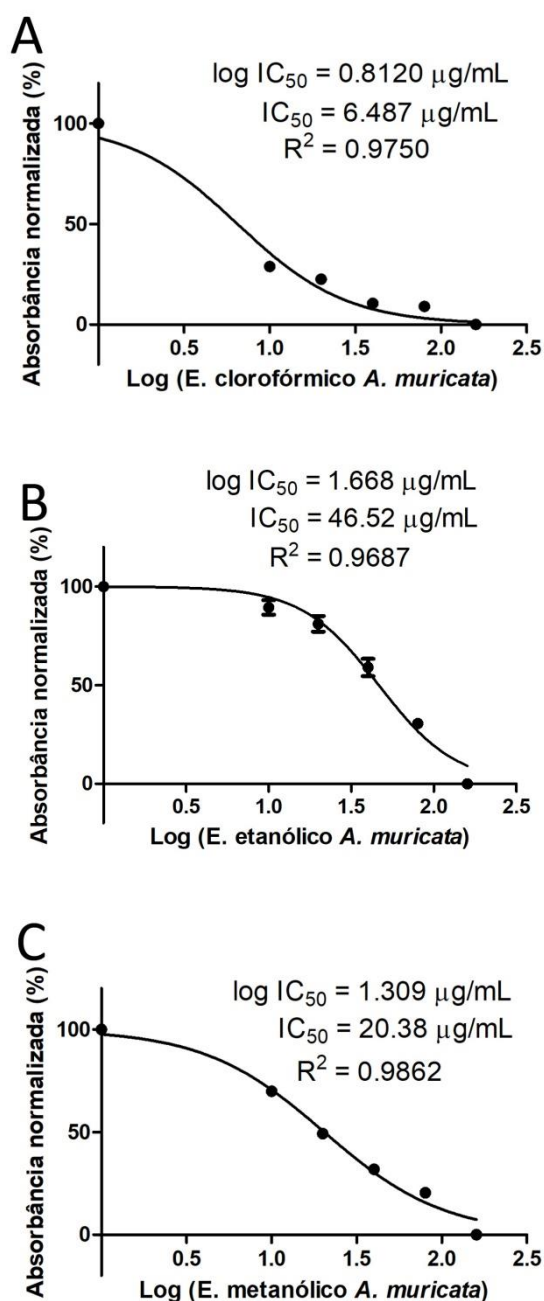
Houve diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade de células SCC-4 controle veículo e tratadas com extrato metanólico de *Annona muricata* estudadas [ $\chi(5)=16,71$ ,  $p<0,05$ ]. Foi observada uma tendência de redução da viabilidade celular com aumento da concentração de extrato metanólico, contudo, somente o extrato metanólico a 160  $\mu\text{g/mL}$  foi estatisticamente menor que o controle veículo (Figura 11).



**Figura 11.** Efeito do extrato metanólico de *Annona muricata*, sobre a viabilidade celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.

Ensaio de incorporação de vermelho neutro por 24 horas. Percentual de células SCC-4 viáveis controle veículo (C) e tratadas com o extrato metanólico nas concentrações: 10  $\mu\text{g/mL}$  (EM10), 20  $\mu\text{g/mL}$  (EM20), 40  $\mu\text{g/mL}$  (EM40), 80  $\mu\text{g/mL}$  (EM80) e 160  $\mu\text{g/mL}$  (EM160). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn: \*\* $p<0,001$ .

Os extratos de *Annona muricata* apresentaram citotoxicidade heterogênea em células SCC-4: extrato clorofórmico com  $IC_{50}=6,48 \mu\text{g/mL}$  ( $R^2=0,9750$ ); etanólico com  $IC_{50}=46,52 \mu\text{g/mL}$  ( $R^2=0,9687$ ) e metanólico com  $IC_{50}=20,38 \mu\text{g/mL}$  ( $R^2=0,9862$ ) (Figura 10).



**Figura 12.** Índice de citotoxicidade dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* em células SCC-4.

Extrato clorofórmico (A), extrato etanólico (B) e extrato metanólico (C). Teste de regressão não linear.

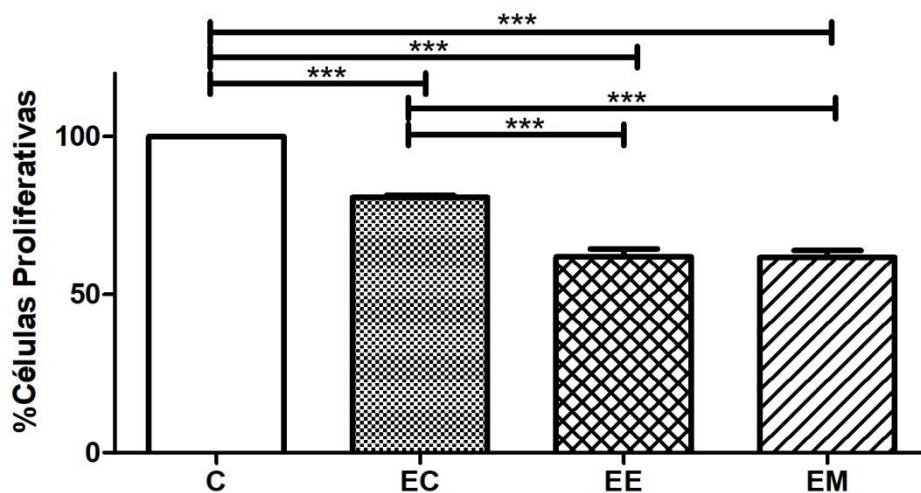


#### 6.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM OS EXTRATOS DE *ANNONA MURICATA* SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO*

Para avaliação da taxa de proliferação, o percentual de células SCC-4 controle veículo e tratadas com os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* foi normalizado e o grupo controle veículo foi considerado como 100% de células proliferativas.

Houve uma diferença estatisticamente significativa do percentual de células SCC-4 proliferativas (BrdU positivas) entre o grupo controle e tratados com os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* [ $F(3,11)=115,755$ ,  $p<0,0001$ ]. Quando comparado ao grupo controle veículo (100% de células proliferativas), o percentual de células proliferativas foi significativamente menor nos grupos tratados com os extratos: clorofórmico ( $80,72\pm 1,29\%$  de células proliferativas), etanólico ( $61,92\pm 4,35\%$  de células proliferativas) e metanólico ( $61,80\pm 3,72\%$  de células proliferativas), correspondendo a uma inibição da proliferação celular de: 19,28%, 38,08% e 38,20%, respectivamente.

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de células proliferativas do grupo tratado com extrato clorofórmico quando comparado com extrato etanólico ( $p<0,0001$ ) e, com o extrato metanólico ( $p<0,0001$ ). Porém, não foi vista uma diferença significativa entre o percentual de células proliferativas tratadas com os extratos etanólico e metanólico de *Annona muricata* ( $p>0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 13. Efeito dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.**

Ensaio de incorporação de BrdU por 6 horas. Percentual de células SCC-4 proliferativas controle veículo (C) e tratadas com os extratos: clorofórmico a 5 µg/mL (EC), etanólico a 45 µg/mL (EE), e metanólico a 20 µg/mL (EM) de *Annona muricata*. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e pós-teste de Tukey: \*\*\* $p < 0,0001$ .

## 7.DISSCUSSÃO

---

Este estudo reportou a atividade citotóxica e antiproliferativa dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado. Tendo em vista que os métodos terapêuticos para o tratamento do carcinoma epidermoide oral podem resultar em sequelas desfigurantes e limitantes (PARÉ e JOLY, 2017), é muito importante o estudo de compostos naturais para tratamento dessa neoplasia, uma vez que o tratamento com plantas medicinais é pouco oneroso e facilmente disponível (PRABHAKARAN *et al.*, 2016).

Plantas medicinais são utilizadas como terapia alternativa contra diversos tipos de cânceres (SEO *et al.*, 2005). E, folhas, cascas, frutos, raízes e sementes de *Annona muricata* são utilizados com finalidade medicinal por anos, no entanto, os mecanismos envolvidos no controle de doenças por essa planta ainda não estão completamente elucidados (ABDUL WAHAB *et al.*, 2018; RADY *et al.*, 2018). Dessa forma, são importantes novas investigações, como este estudo, para elucidar os efeitos da folha de graviola na carcinogênese e na progressão tumoral.

Neste estudo foram utilizados os solventes: clorofórmio, etanol e metanol para a extração de compostos bioativos de folhas de *Annona muricata*. Outros solventes como o N-hexano, N-butanólico, pentano, DMSO, hexano e acetato de etila, também, podem ser utilizados na confecção de extratos de *Annona muricata*, uma vez que, cada um desses demonstra um potencial exclusivo na extração de compostos bioativos do material vegetal (RADY *et al.*, 2018). Previamente, foi relatado a presença de alcaloides, saponinas, terpenoides, flavonoides, cumarinas e outras lactonas, antroquinonas, taninos, glicosídeos cardíacos, fenóis, fitoesteróis, megastigmanos, ciclopeptídeos, óleos, minerais essenciais como, o K, Ca, Na, Cu, Fe e Mg e acetogeninas anonáceas em diferentes extratos orgânicos de *Annona muricata* (YAJID *et al.*, 2018).

O presente estudo identificou a presença de taninos, flavonóis e flavonas, no entanto, não foram detectados qualitativamente alcaloides nos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata*. A capacidade de extração de taninos, flavonóis e flavonas foi similar nos extratos etanólico e metanólico (solventes polares) e diferente em extrato clorofórmico (solvente

apolar). A extração de compostos hidrofílicos, como os taninos é mais eficiente quando o solvente possui a mesma polaridade, como o etanol e o metanol. Por outro lado, a extração de compostos hidrofóbicos como os flavonoides das subclasses flavonois e flavonas, testados nesse estudo, foi mais eficiente em clorofórmio, solvente apolar. Os taninos e flavonoides apresentam atividade farmacológica como agentes anti-inflamatórios, antifúngicos, antioxidantes e cicatrizantes (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004).

Os resultados obtidos não excluem a presença de compostos exclusivos da Família Annonaceae, as acetogeninas anonáceas. Estas exercem atividade antitumoral inclusive em células resistentes aos quimioterápicos, e são capazes de paralisar o ciclo celular, e, conseqüentemente, levar à inibição da proliferação celular (YAJID *et al.*, 2018). E ainda, são capazes de induzir citotoxicidade por inibição do complexo mitocondrial I, que está envolvido na síntese de ATP. Células tumorais necessitam de uma maior demanda de ATP comparadas às células saudáveis, desse modo, os inibidores do complexo mitocondrial I podem ser utilizados na terapia anticâncer (PAES *et al.*, 2016). Aproximadamente sete acetogeninas anonáceas demonstraram atividade antiproliferativa, são elas: muricina J, muricina K, muricina L (SUN *et al.*, 2014), muricina M, muricina N, muricenina (SUN *et al.*, 2016) e anomuricina (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015).

Os ensaios capazes de quantificar a porcentagem de células que sintetizam DNA durante determinado período de tempo são considerados padrão ouro para avaliar a proliferação celular (MEAD e LEFEBVRE, 2014). Um desses métodos utilizado neste estudo, o ensaio de incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), é capaz de avaliar a replicação do DNA, por ser incorporado a este durante a fase de síntese no lugar da timidina (GRATZNER, 1982; WOJTOWICZ e KEE, 2006). A proliferação é um evento complexo e altamente coordenado, fundamental para o desenvolvimento de organismos e homeostase. Esse processo ocorre em quatro fases consecutivas: G1, S, G2 e M. Nas fases iniciais a célula aumenta de tamanho, sintetiza proteínas e duplica o material genético, e, somente na fase M acontece efetivamente a divisão celular (MATSON e COOK, 2017). Em células tumorais, a expressão e a atividade de proteínas relacionadas com o ciclo celular estão alteradas, resultando em

crescimento desordenado, proliferação celular descontrolada e progressão tumoral (SEVER e BRUGGE, 2015). Embora, frequentemente, os ensaios utilizados para determinar a viabilidade também sejam utilizados para investigar a proliferação celular (STODDART, 2011), a viabilidade celular é definida apenas como o número de células saudáveis em cultura.

O ensaio de incorporação do vermelho neutro, utilizado neste estudo, é capaz de mensurar a quantidade de células vivas, lesionadas ou mortas, por atravessar as membranas celulares e se acumular nos lisossomos de células viáveis (TRIGLIA *et al.*, 1991; FOTAKIS e TIMBRELL, 2006). Já o ensaio de exclusão de azul de trypan, também é utilizado para avaliar a viabilidade celular, uma vez que, apenas células vivas possuem membranas intactas capazes de excluir o azul de trypan (STROBER, 2015). E, o ensaio de MTT é um método colorimétrico amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade (MOSMANN, 1983), esse ensaio avalia a capacidade das mitocôndrias e do retículo endoplasmático rugoso reduzirem o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio, em cristais insolúveis de azul de formazan (GRELA *et al.*, 2018). Por meio dos ensaios de viabilidade é calculada a concentração Inibitória média,  $IC_{50}$ , que é o valor da concentração de um composto necessária para reduzir 50% das células em cultura, sendo que, quanto menor o valor do  $IC_{50}$ , mais potente será o composto testado (ADAN *et al.*, 2016).

Previamente, foi demonstrado que o extrato aquoso de folhas de *Annona muricata* inibiu a proliferação de células SCC-25, também de carcinoma epidermoide oral, porém, os autores utilizaram o dobro e o quádruplo (25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) da concentração determinada como  $IC_{50}$  (12,42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (MAGADI *et al.*, 2015).

Embora neste estudo, o extrato clorofórmico tenha sido citotóxico para células SCC-4 com  $IC_{50}$  de apenas 6,487  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 h, em outros tipos de câncer a concentração necessária para afetar a viabilidade de 50% das células em cultura foi muito superior, ressaltando que o índice de citotoxicidade varia de acordo com a linhagem utilizada. Em células Hela de câncer de colo de útero, um índice citotóxico do extrato clorofórmico foi de 127,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em 24 h, determinado por MTT (ARTANTI *et al.*, 2016), e foi mais citotóxico que os extratos preparados com os solventes: etanol, n-hexano e acetato de etila, determinado por meio do ensaio de

exclusão de azul de trypan (ASTIRIN *et al.*, 2013). Em células Raji de câncer de nasofaringe foram testadas as concentrações 61, 125 e 250 µg/ml por 24 h e determinado IC<sub>50</sub> de 90,6 µg/ml (ARTANTI *et al.*, 2016).

Este estudo demonstrou pela primeira vez, por meio do ensaio de incorporação de BrdU, marcador de proliferação celular, que os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* reduzem a proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, e, provavelmente, esse processo ocorre por meio de vias intracelulares envolvidas na proliferação celular. De acordo com a literatura, os componentes da graviola reduzem a proliferação celular por meio da inibição de vias de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), causando a regulação negativa da via PI3K/AKT (RADY *et al.*, 2018), que possui um papel importante no controle do ciclo celular (FRUMAN e ROMMEL, 2014), e está frequentemente alterada no câncer, o que a torna um potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais (FAES e DORMOND, 2015).

A ativação desordenada de vias de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) e do fosfatidilinositol-3-quinases (PI3K/Akt) está associada com a proliferação e sobrevivência de células de câncer de pâncreas, e a inibição dessas vias acarreta na inibição do crescimento de células tumorais (YAJID *et al.*, 2018). O tratamento de células de câncer de pâncreas com pó de folhas e caule de *Annona muricata* solubilizados em DMSO resultou em uma diminuição da ativação de vias: ERK e PI3K/Akt. Desse modo, a inibição dessas vias está relacionada com a diminuição da viabilidade de células tumorais de pâncreas. Os mesmos autores também sugerem que os extratos de *Annona muricata* reduzem a motilidade das células cancerosas pancreáticas, podendo atuar para inibir a metástase, uma vez que, a capacidade migratória de células cancerígenas do pâncreas foi menor após o tratamento com extrato de *Annona muricata* (TORRES *et al.*, 2012).

Os extratos vegetais confeccionados com os solventes etanol e metanol são os mais comumente utilizados para induzir citotoxicidade contra células tumorais (RADY *et al.*, 2018), e ambos foram testados no presente estudo. O extrato etanólico de folhas de *Annona muricata* contém inúmeros compostos bioativos citotóxicos para uma variedade de células tumorais (GAVAMUKULYA *et al.*, 2014). Esse extrato foi

citotóxico para células A375 de melanoma humano com  $IC_{50}$  de 20  $\mu\text{g/mL}$  em 24 e 72 h, pelo método de incorporação de hipoxantina-[3H] (MÉNAN *et al.*, 2006). Por ensaio de MTT, também, foi citotóxico em células COLO-205 de câncer colorretal com um valor de  $IC_{50}$  de 189,6  $\mu\text{g/mL}$  em 48 h (ABDULLAH *et al.*, 2017); nas linhagens HepG2 de câncer hepático e HCT116 de câncer de cólon com  $IC_{50}$  igual a 150  $\mu\text{g/mL}$  para ambas em 24 e 48 h (LIU *et al.*, 2016); em células HL-60 de leucemia promielocítica humana com  $IC_{50}$  de 14  $\mu\text{g/mL}$  em 48 h (PIEME *et al.*, 2014).

Por meio do ensaio de incorporação do vermelho neutro, o extrato de folhas de *Annona muricata* foi testado em diferentes concentrações para determinar o  $IC_{50}$  em células SCC-4. Utilizando o mesmo ensaio, também foi testado em células K562 de leucemia mieloide humana nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0  $\text{mg/mL}$ , e reportaram citotoxicidade máxima na concentração de 2,5  $\text{mg/mL}$ , além de um aumento significativo das taxas de apoptose (EZIRIM *et al.*, 2013). E, por exclusão do corante azul de trypan, induziu a morte de células EACC de carcinoma de ascite de Ehrlich com  $IC_{50}$  de 335,85  $\mu\text{g/mL}$ , também foi relatado que na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  houve 32,9% de morte celular e na concentração de 750  $\mu\text{g/mL}$  foi detectado 100% de morte celular, e, este mesmo estudo, também relatou citotoxicidade para as linhagens MDA e SKBR3 de câncer de mama com um  $IC_{50}$  de 248,77  $\mu\text{g/mL}$  e 202,33  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (GAVAMUKULYA *et al.*, 2014). E, o tratamento de ratos wistar com 300  $\text{mg/kg}$  desse extrato por via oral exibiu efeito anticâncer por redução de criptas aberrantes no cólon (EGGADI *et al.*, 2014).

Neste estudo, o extrato metanólico obtido de folhas de *Annona muricata* foi citotóxico para células SCC-4 com  $IC_{50}$  de 20,38  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas. Esse extrato, também, foi citotóxico para células HEp-2 de câncer de laringe e células NCI-H292 de carcinoma pulmonar humano (GOMES DE MELO *et al.*, 2010). Também foi relatada uma inibição de 80% do crescimento de células HeLa de câncer cervical com o extrato metanólico de folhas de *Annona muricata*, com um  $IC_{50}$  de 50,74  $\mu\text{g/mL}$  (PAUL *et al.*, 2013). Curiosamente, o  $IC_{50}$  em queratinócitos controle foi semelhante aos visto em células A431 e UW-BCC1 de câncer de pele não melanoma de 59,1, 52,9 e 50,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, em 24 e 48 h (CHAMCHEU *et al.*, 2018).



## **8.CONCLUSÃO**

---

Os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* exercem efeito citotóxico, diminuindo a viabilidade celular, e antiproliferativo em carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado *in vitro*.

- Os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* possuem entre seus compostos bioativos taninos, flavonóis e flavonas, no entanto, os alcaloides não são detectáveis pelo método utilizado.

- Os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* são citotóxicos para células SCC-4, apresentando índices de citotoxicidade diferentes.

- A taxa de proliferação de células SCC-4 tratadas com os extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* diminui em relação ao controle.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDUL WAHAB, S. M. et al. Exploring the Leaves of *Annona muricata L.* as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 661, 2018.

ABDULLAH, M. et al. The Value of Caspase-3 after the Application of *Annona muricata* Leaf Extract in COLO-205 Colorectal Cancer Cell Line.. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2017, p. 4357165, 2017.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, p. 1213-1221, 2016.

ARTANTI, A. N.; ASTIRIN, O. P.; PRAYITNO, A. Cytotoxic Activity Of Non Polar Fraction From *Annona Muricata L.* Leaves On Hela And Raji Cell Line. **J Pharma Sci Clin Res**, v. 01, p. 112-118, 2016.

ASARE, G. A. et al. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata L.* on the prostate, BPH-1 cells, and some target genes. **Integr Cancer Ther**, v. 14, p. 65-74, 2015.

ASTIRIN, O. P. et al. *Annona muricata* linn leaf induce apoptosis in cancer cause virus. **J Cancer Ther**, v. 4, p. 1244-1250, 2013.

AYAZ, M. et al. Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants. **Front Aging Neurosci**, v. 9, p. 168, 2017.

BANERJEE A et al. Possible Cytotoxic Activity of *Annona muricata* Leaves in Huh-7 Human Liver Cancer Cells. **Hepatol Pancreat Sci**, v. 1, p. 1-6, 2017.

BLATT, S. et al. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 45, p. 722-730, 2017.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett**, v. 24, p. 119-124, 1985.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009. 364 p.

CHAMCHEU, J. C. et al. Graviola (*Annona muricata*) Exerts Anti-Proliferative, Anti-Clonogenic and Pro-Apoptotic Effects in Human Non-Melanoma Skin Cancer UW-BCC1 and A431 Cells In Vitro: Involvement of Hedgehog Signaling. **Int J Mol Sci**, v. 19, p. E1791, 2018.

CHANG, C. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **J Food Drugs Anal**, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHIH, H. W. et al. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. **Life Sci**, v. 69, n. 11, p. 1321-1331, 2001.

CORIA-TÉLLEZ, A. V. et al. *Annona muricata*: a comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian J Chem**, v. 30, p. 662-691, 2016.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.3, 1978, 486 p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. v. II, 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1994. 1038 p.

DE MORAIS, E. F. et al. Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 75, p. 1555-1566, 2017.

ECONOMOPOULOU, P. et al. The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): anti-tumor immunity and clinical applications. **Ann Transl Med**, v. 4, p. 173, 2016.

EGGADI, V. et al. Evaluation of anticancer activity of *Annona muricata* in 1, 2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. **World Applied Sciences Journal**, v. 32, p. 444-450, 2014.

EZIRIM, A. U. et al. Induction of apoptosis in myelogenous leukemic k562 cells by ethanolic leaf extract of *Annona muricata* L. **Global J. Res Med Plants & Indigenous Med**, v. 2, p. 142-151, 2013.

FAES, S.; DORMOND, O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, p. 21138-21152, 2015.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v. 160, p. 171-177, 2006.

FRUMAN, D. A.; ROMMEL, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, p. 140-156, 2014.

GANESH, D. et al. Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. **Anticancer Res**, v. 38, p. 3223-3229, 2018.

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pac J Trop Med**, v. 7S1, p. S355-5363, 2014.

GOMES DE MELO, J. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, p. 8534-8542, 2010.

GRATZNER, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. **Science**, v. 218, p. 474-475, 1982..

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. **Acta Histochem**, v. 120, p. 303-311, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. 128 p.

INDRAWATI, L. et al. The effect of an *Annona muricata* leaf extract on nutritional status and cytotoxicity in colorectal cancer: a randomized controlled trial. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 26, p. 606-612, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 554 p.

KADEMANI, D. Oral cancer. **Mayo Clin Proc**, v. 82, p. 878-887, 2007.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia- Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 1440 p.

LIAW, C. C. *et al.* Acetogenins from Annonaceae. **Prog Chem Org Nat Prod**, v. 101, p. 113-230, 2016.

LIMA, M. A. C. D.; ELESBÃO, A. R.; FILGUEIRAS, H. A. C. Changes related to softening of soursop during postharvest maturation. **Pesq Agro Bras**, v. 41, n.12, p.1707-1713, 2006.

LIU, N. et al. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. **J Ethnopharmacol**, v. 189, p. 210-217, 2016.

MACHIELS, J. P. et al. Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 44, 2014.

MAGADI, V. P. et al. Evaluation of cytotoxicity of aqueous extract of Graviola leaves on squamous cell carcinoma cell-25 cell lines by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-Yl) -2,5-

diphenyltetrazolium bromide assay and determination of percentage of cell inhibition at G2M phase of cell cycle by flow cytometry: An *in vitro* study. **Contemp Clin Dent**, v. 6, p. 529-33, 2015.

MATSON, J. P.; COOK, J. G. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. **FEBS J**, v. 284, p. 362-375, 2017.

MEAD, T. J.; LEFEBVRE, V. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. **Methods Mol Biol**, v. 1130, p. 233-243, 2014.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **Int J Mol Sci**, v. 16, p. 15625-15658, 2015.

\_\_\_\_\_. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- $\kappa$ B. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 299, 2014.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 24, p. 491-508, 2015.

MORO, J. D. S. et al. Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 16, n.2, p. 1-5, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÉNAN, H. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. **J Ethnopharmacol**, v. 105, p. 131-136, 2006.

NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology Development, Structure and Function**. 8 ed., Missouri: Elsevier. 2013. 400 p.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009. 972 p.

PADMA, R. et al. The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 21, p. 461, 2017.

PAES, M. M. et al. Potencial citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. **Rev Virtual Quim**, v. 8, p. 945-980, 2016.

PARÉ, A.; JOLY, A. Oral cancer: Risk factors and management. **Presse Med**, v. 46, p. 320-330, 2017.

PAUL, J. et al. Anti cancer activity on Graviola, an exciting medicinal plant extract vs various cancer cell lines and a detailed computational study on its potent anti-cancerous leads. **Curr Top Med Chem**, v. 13, p. 1666-1673, 2013.

PEREIRA, M. C. et al. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **J Can Dent Assoc**, v. 73, p. 339-44, 2007.

PIEME, C. A. et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 516, 2014.

PORTER, S. et al. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 125, p. 603-611, 2018.

PRABHAKARAN, K. et al. Polyketide Natural Products, Acetogenins from Graviola (*Annona muricata L*), its Biochemical, Cytotoxic Activity and Various Analyses Through Computational and Bio-Programming Methods. **Curr Pharm Des**, v. 22, p. 5204-5210, 2016.

QAZI, A. K. et al. Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers. **Carcinogenesis**, v. 39, p. 522-533, 2018.

QIN, R.; STEEL, A.; FAZEL, N. Oral mucosa biology and salivary biomarkers. **Clin Dermatol**, v. 35, p. 477-483, 2017.

RADY, I. et al. Anticancer Properties of Graviola. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 1-39, 2018.

RIVERA, C. et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **Oral Oncol**, v. 72, p. 38-47, 2017.

ROCHA, J. C. C.; SILVA, S. N. **Oncogenética**. In: Coelho FRG, Kowalski LP. Bases da Oncologia. 2 ed. São Paulo: TECMEDD. 2003. 700 p.

RUBACK, M. J. et al. Clinical and epidemiological characteristics of patients in the head and neck surgery department of a university hospital. **Sao Paulo Med J**, v. 130, p. 307-313, 2012.

SAH, A. K. et al. Application of nanocarrier-based drug delivery system in treatment of oral cancer. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 46, p. 650-657, 2018.

SARASWATHY, M.; GONG, S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. **Biotechnol Adv**, v. 31, p. 1397-407, 2013.

SEIGLER, D. S. et al. **Tannins from four common *Acacia* species of Texas and Northeastern Mexico**: 220-232 p. 1986.



SEO, U. K. et al. Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. **J Ethnopharmacol**, v. 97, p. 101-6, 2005.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, p. a006098., 2015.

SRIVASTAVA, V. et al. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg Med Chem**, v. 13, p. 5892-5908, 2005.

STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. **Methods Mol Biol**, v. 740, p. 1-6, 2011.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Curr Protoc Immunol**, v. 111, p. A3.B.1-3, 2015.

SUN, S. et al. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, p. 2773-2776, 2014.

\_\_\_\_\_. Isolation of three new annonaceous acetogenins from Graviola fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, p. 4382-4385, 2016.

SYED NAJMUDDIN, S. U. et al. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, p. 311, 2016.

TANDON, P. et al. The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our Rural Health Care Centre in Loni, Maharashtra - a retrospective 10-year study. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 21, p. 178-183, 2017.

TEIXEIRA, C. K. B.; NEVES, E. C. A.; PENA, R. D. S. Estudo da Pasteurização da Polpa de Graviola. **Revista de Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 251-257. 2006.

TEN CATE, R. **Histologia Bucal**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2001. 439 p.

THOMSON, P. J. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction. **J Oral Pathol Med**, v. 47, p. 803-807, 2018.

TORRES, M. P. et al. Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and *in vivo* through altering cell metabolism. **Cancer Lett**, v. 323, p. 29-40, 2012.

TRIGLIA, D. et al. *In vitro* toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 27A, p. 239-244, 1991.

VEIGA, V. F. Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North Region of the Rio de Janeiro State: acceptance by health professionals, way of use of the population: Services on Demand. **Rev Bras Farmacognosia**. p. 308-313, 2008.

WOJTOWICZ, J. M.; KEE, N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. **Nat Protoc**, v. 1, p. 1399-1405, 2006.

YAJID, A. I. et al. Potential Benefits of. **Malays J Med Sci**, v. 25, p. 5-15, 2018.

YANG, C. et al. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, p. 656-665, 2015.

ZENG, L. et al. Recent advances in Annonaceous acetogenins. **Nat Prod Rep**, v. 13, p. 275-306, 1996.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of Acetogenin Annomuricin E in HT-29 cells: a bioassay-guided approach. **PLoS One**, v. 10, p. e0122288, 2015.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In Simões CMO (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/Ed. UFSC. 2004.p. 577-614.

## **10. ANEXOS**

---

Anexo 1. Certificado de análise de folhas de *Annona muricata*

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

PRODUTO: GRAVIOLA RASURA	Cod GRAVR	GRAU ALIMENTICIO	
Nome Científico: <i>Annona muricata</i> L.		Método de Secagem:	A SOMBRA
Família: Amnonaceae		Solvente de Extração:	.
Parte Utilizada: FOLHAS E TALOS		Excipiente:	.
Lote: AUTO6601		Esterilização:	Não
Origem/Procedência: BRASIL		GMO:	LIVRE
Fornecedor: .		BSE:	LIVRE
Lote do Fornecedor: .		Nº Certificado de Análise:	.
Data da Colheita: 07/12/2016		Data Emissão do Certificado:	21/09/2018
Data de Fabricação: 09/12/2016			
Data de Validade: 09/12/2019			

### ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E DOSEAMENTO DE ATIVOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	REFERÊNCIA
Aspecto	FOLHAS RASURADAS	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5ªED. VOL I, P. 189-190
Cor	VERDE ACASTANHADAS	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5ªED. VOL I, P. 189-190
Odor	CARACTERISTICO	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5ªED. VOL I, P. 189-190
Sabor	CARACTERISTICO	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5ªED. VOL I, P. 189-190
Água (105°C em Estufa)	MAXIMO 17%	10,97%	FARM. BRASILEIRA 5ªED. VOL I, P. 194
Cinzas Totais	MAXIMO 18%	4,64%	FARM. BRASILEIRA 5ªED. VOL I, P. 195
Material Estranho	MAXIMO 2%	AUSENTE	FARM. BRASILEIRA 5ªED. VOL I, P. 194
Análise 1	TEOR DE OLEO ESSENCIAL - MINIMO 0,3%	1,39%	INSTITUTO ADOLFO LUTZ. IV ED. P.884-885
Análise 2	TESTE PARA ALCALOIDES - POSITIVO	POSITIVO	SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA

**Observações:**

- Mudança de cor pode ocorrer devido ao fato de que o produto é de origem vegetal/animal
- Armazenamento em local seco e arejado, sem umidade e calor
- Ensaios complementares podem ser realizados com custos adicionais
- NR - Não Realizado
- NA - Não Aplicável
- Esterilização sob consulta

ANDREA BERNARDES  
FARMACEUTICA RESPONSAVEL - CRF/SP: 13.987

**SANTOSFLORA COMERCIO DE ERVAS LTDA**  
51.569.309/0004-80  
Estrada Dr Alipio Leme 4555 - Terra Preta - Mairipora-SP - CEP.07600000 - Brasil  
Telefone +55 11 3195 0300 / Fax +55 11 3195 0303  
laboratorio@santosflora.com.br - www.santosflora.com.br  
Cadastro Anvisa Nº CAD 6.02.671-1

**Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS - ICBN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL  
3318 5463 - 3318 5427 - virginiacrema@icbn.uftm.edu.br

Memorando nº 47/2012/HISTOLOGIA/ICBN/UFTM

Uberaba, 04 de junho de 2012

Ana Palmira Soares dos Santos  
Coordenadora do CEP/UFTM

Prezada Coordenadora,

Tendo em vista que não haverá o envolvimento de seres humanos, solicitamos a dispensa de Parecer do CEP/UFTM para Projeto de Pesquisa intitulado "Regulação de processos biológicos em carcinoma epidermoide oral", utilizando linhagens celulares disponíveis comercialmente.

Atenciosamente,

*Virginia Oliveira Crema*  
Profa. Dra. Virginia Oliveira Crema

Responsável pela Disciplina de Histologia dos  
Cursos Biomedicina e Fisioterapia

*Aprovado em  
15/6/2012*

*[Assinatura]*  
Profa. Ana Palmira Soares dos Santos  
Coordenadora do CEP da UFTM

**Anexo 3. Citotoxicidade dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico de *Annona muricata* em células SCC-4.**

Extratos de <i>Annona muricata</i>	Concentrações (µg/mL)	Viabilidade células SCC-4 (%±dp)
Clorofórmico	10	35,69±0,80
	20	29,94±0,46
	40	19,11±0,61
	80	17,78±0,23
	160	9,62±0,69
Etanólico	10	92,46±4,59
	20	86,55±4,90
	40	70,79±5,40
	80	50,52±1,91
	160	28,73±0,40
Metanólico	10	73,92±0,20
	20	56,08±1,60
	40	41,13±0,20
	80	31,17±0,40
	160	13,55±0,34

dp - desvio padrão